



体外培養系を用いた胎盤系列細胞の分化制御に関する研究

著者	本村 香織
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7769号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00143468

氏名	本村 香織
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 7769 号
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	体外培養系を用いた胎盤系列細胞の分化制御に関する研究

主査	筑波大学教授 (連携大学院)	農学博士	小倉 淳郎
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	柏原 真一
副査	筑波大学准教授 (連携大学院)	博士 (理学)	井上 貴美子

論 文 の 要 旨

trophoblast stem (TS)細胞は、胎盤系列の細胞(trophoblast)に寄与する人為的に作出された幹細胞である。マウスにおいては、胚盤胞の栄養外胚葉(TE)もしくは受精後6.5日目の胚体外外胚葉(ExE)から樹立され、FGFシグナルに依存して自己複製能を維持している。しかしながら、胎仔側のcounterpartである胚性幹細胞(ES細胞)に比べて、TS細胞は、細胞集団が不均一で、容易に分化してしまう性質がある。そのコロニー形態においても、扁平な形態が一般的とされるが、他にもドーム型など数種のコロニーが観察され、不均一な状態となっている。そこで本研究は、マウスのTS細胞の品質改善のために、マウスTS細胞培養中に観察される形態の異なるコロニーに着目し、それらのコロニーを形態学的に分類し、未分化コロニーの同定および幹細胞株として維持される機構を明らかにすることを目的として実施した。具体的には、最も未分化な状態のコロニーを同定するために、各コロニータイプにおけるキメラ形成能の違いを解析するとともに、遺伝子発現プロファイルの異なるコロニータイプ間で、正確な遺伝子発現量解析を行うために、変動の少ないリファレンス遺伝子の同定を試みた。

1. 異なる形態のTS細胞コロニーにおける未分化性の評価

TS細胞培養中に観察される、形態学的特徴の異なるコロニーを5種に分類した。各コロニーの特徴は、type 1 (ドーム型のコンパクトコロニー)、type 2 (扁平型のコンパクトコロニー)、type 3 (中心部分にクラスターを形成するtype 2様コロニー)、type 4 (細胞同士の接着が弱いコロニー)、type 5 (扁平だが、敷石状で個々の細胞が明瞭なコロニー)である。これら5種のコロニーは、type 5で未分化マーカーCdx2陰性の細胞が認められるものの、type 1からtype 4は同等のCdx2発現を示した。また、type 2からtype 5はtype 1コロニーから派生したことから、type 1コロニーが全てのコロニータイプのprogenitorであることが同定された。さらに、ドーム型type 1と扁平型type 2は類似した遺伝子発現プロファイルを持ち、同等のキメラ形成能を持つこと、type 4はtype 1やtype 2に対して細胞接着のタイトジャンクションに関連する遺伝子が減少しており、キメラ形成能が著しく低下していることが明らかとなった。さらに、type 3、type 4でTS細胞未分化マーカーの1つであるElf5発現が有意に低下することが明らかとなった。

2. TS細胞の遺伝子発現量解析における適切な補正遺伝子の同定

Type 5を除く4種類のコロニータイプ(type 1, type 2, type 3, type 4)における、変動の少ないリファレンス遺伝子を同定することを目的として、geNormアルゴリズムを用いた解析を試みた。2つのコロニー間で最も発現変動が少ない遺伝子はGapdhであることが明らかとなった。geNormアルゴリズムを用いて、複数のリファ

レンス遺伝子による補正を行った結果、Gapdhを含む、発現変動の少ない複数のリファレンス遺伝子で補正した場合と、Gapdh単独での補正は、同様の解析結果が得られることが示された。

本研究により、最も未分化なコロニー形態の同定と、その遺伝子発現プロファイルを明らかにし、TS細胞の未分化状態を評価する新たなマーカー遺伝子として、Elf5が信頼できることを示した。本研究により、今後のTS細胞の品質評価において重要になる情報を得ることができた。

審 査 の 要 旨

幹細胞の品質改善・維持は、生物学的にも意義があるのみならず、産業・医学応用面でも重要な課題である。しかしながら本研究に用いたマウス TS 細胞は、1998 年に初めて樹立されてからすでに 20 年が経過しようとしているにもかかわらず、培養方法およびその性質にほとんど改善が行われていない。本村氏は、この理由の一つとして、不均一な細胞集団である TS 細胞をバルクで解析をしていることに原因があると考え、最初にコロニータイプの分類を行い、それぞれのタイプの遺伝子発現、キメラ形成能、構成する細胞種を解析した。その結果、ドーム型のコロニー(type 1)が最も未分化コロニーであり、そこに含まれる小型の不定形細胞が幹細胞としての性質を維持していることを明らかにした。また、通常用いられている trophoblast マーカー遺伝子である Cdx2 よりも Elf5 が、厳密な未分化性の指標になることを示すことができた。今後、Elf5 を指標に、この type 1 コロニーに含まれる細胞の比率を増やす技術を開発することで、マウス TS 細胞が、ES 細胞同様に高品質な幹細胞として生まれ変わると期待される。よって、本研究の成果は、今後の医生物学の発展に寄与するものと考えられる。

平成 28 年 1 月 21 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。

